

⑫ 公開特許公報(A) 平2-2385

⑬ Int. Cl.⁴

C 12 P 21/00

識別記号

C

片内整理番号

6712-4B
8717-4B
7421-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)1月8日

C 12 N 15/00
1/16

A
K※

審査請求 有 請求項の数 10 (全10頁)

⑮ 発明の名称 蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物の製法

⑯ 特 願 昭64-166

⑰ 出 願 昭64(1989)1月5日

優先権主張 ⑱ 1988年1月5日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3800134.9

㉑ 発 明 者 データー・ハインリッヒ・ドイツ連邦共和国グンデルフィンゲン・リンゼンシュトラ
ツヒ・ヴォルフ ーセ 61

㉒ 出 願 人 ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ドイツ連邦共和国マンハイム31・ザントホーフエルストラ
ト・ミット・ベシュレ ーセ 116
ンケテル・ハフツング

㉓ 代 理 人 弁理士 矢野 敏雄 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物の製法

2 特許請求の範囲

1. 真核生物の宿主細胞を、所望の蛋白質の遺伝子を含有する超螺旋体 DNA 分子で形質転換し、細胞を培養しかつ発現後に遺伝子生産物を分離することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物を製造する方法において、宿主細胞として、プロテアーゼ A 及び B が欠損している酵母菌株を使用することを特徴とする、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物の製法。

2. 追加的に、該酵母菌株はプロテアーゼ D が欠損している請求項1記載の方法。

3. 追加的に、該酵母菌株はカルボキシペプチダーゼ Y 及びノ又は Z が欠損している請求項1又は2記載の方法。

4. 酵母菌株 ABYSO - 11, DBM 4322 を使用する請求項1記載の方法。

5. プロテアーゼ欠損酵母菌株を他の栄養要求性及び/又は薬剤感受性酵母菌株と交雑させ、孢子形成させかつ生じたハイブリッド菌株から栄養要求性及び/又は薬剤感受性を介して選択した後で、少なくともプロテアーゼ A 及び B が欠損しておりかつ親株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性の少なくとも一方を有する酵母菌株を分離し、かつこのハイブリッド菌株を宿主細胞として使用する請求項1から4までのいずれか1項記載の方法。

6. 酵母菌株 ABYSO - 11, DBM 4322 を菌株 YCY 2824 - 1A, DBM 4317 又は DBY 746, DBM 4316 と交雑させ、プロテアーゼ A, B 及びカルボキシペプチダーゼ Y 及び Z 並びに場合によりプロテアーゼ D が欠損しておりかつ親株のウラシル、リジン及びマルトース有効化栄養要求性、ロイシン及びトリプトファン - 又はロイシン、ウラシル及びヒスチジン栄養要求性を有する菌株を分離し、かつそれを宿主細胞として

使用する請求項5記載の方法。

7 付加的に、宿主細胞の栄養要求性及び/又は薬剤感受性を相継り遺伝子1種以上を含有する組換え体DNA分子を使用する請求項5又は6記載の方法。

8 組換え体DNA分子として複合ベクター又は嵌合性DNAフラグメントを使用する請求項1から7までのいずれか1項記載の方法。

9 組換え体DNA分子が高いコピー数で細胞中に発出する特許プラスミドである請求項8記載の方法。

10. α-グルコシダーゼ(FI)を製造する請求項1から9までのいずれか1項記載の方法。

3 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、遺伝子工学的方法で、真核生物の宿主細胞を、所望の蛋白質の遺伝子を含有する組換え体DNA分子で形質転換し、その細胞を用いて、かつ遺伝子生産物を公知方法で単離することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物を製造する方法に関する。

フクタイル ボダイ(refractile bodies)として生じる。多くの真核生物の蛋白質は、B. コリ中では不溶性で発現され、S. セレビシエ中では溶解かつ活性で形成される。["Biotechnology and Genetic Engineering Reviews", 3, 377-416頁(1985年)]。とりわけこのことは、酵母が典型的な真核生物の模型細胞であり、例えば蛋白質の折りたたみ、無菌培養、グリコシル化及びアセチル化を介して分泌可能でありかつポリペプチド及び蛋白質中のジスルフィド橋の形成を可能にすることにより容易である。更に、酵母は病理性ではなくかつB. コリとは異なり毒素及び発熱性細胞成分を含有していない。

酵母は人間の最も古い培養微生物の一つである。今でも主としてアルコール飲料(ワイン、ビール等)に及びドワ製品の「ベーキング粉(Backlife)」として使われている。それと同時に、酵母は例えばNAD、ATP及びグルタミン酸のような低分子物質及び例えばDNA、RNA

等を製造する方法に関する。

従来の技術

今日、臨床化学のパラメータの測定は大規模に酵素法で行なわれる。そのために必要な試薬の製造に使われる酵素は植物又は動物に由来する種々の原料からあるいは微生物から得られる。

酵素及び他の蛋白質の製造に當つて、微生物がますます重要になつてゐる。それといふのも微生物だけが醗酵により低廉の量で使用可能であり、従つて多量の蛋白質の単離が可能だからである。特に重要なのは菌類のように例えばサッカロミセス セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)のような酵母である。それといふのもこの生体中では蛋白質の相同発現が真核生物の例えば市販に漁獲する蛋白質の相同発現と全く同様可能である。これに対して、最も頻りに使われる宿主生体のB. コリ中では多数の非同相発現蛋白質は相同系で発現されるその天然物とは異なりかつ生物学的に活性ではないか、あるいは不活性の不活性蛋白質製剤物(レ

及びとりわけ酵素、例えばアルコール-デヒドロゲナーゼ、アルデヒド-デヒドロゲナーゼ、アセチル-CoA-シンターゼ、α-グルコシダーゼ、グリセリンアルデヒド-3-ホスファートデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-ホスファート-デヒドロゲナーゼ及びヘキソキナーゼのような高分子物質を単離するための臨床原料として工業的に重要である。酵母は簡単に培養することができかつ最良の経験から工業的規模で簡単に醗酵させることができる。下等な真核生物に含まれる非同相発現の酵母は真核生物の典型的な特徴を有するが、遺伝学的実験及び生化学的操作に使い易く、特に組換えDNA工学的点で宿主生物として好適であり、つまり生物学的に活性なポリペプチド及び蛋白質の相同及び非同相発現に好適である。

しかしながら死んでいる場合、酵母中で蛋白質を発現する前に、形成される蛋白質の量が不十分である。しばしば、形成された微生物のバイオマスが上昇するにもかかわらず、収量の定

常態期に到達後、所望の蛋白質の特異的活性が定常期の間に低下するのが認められる。これは、とりわけ増殖特異的プロテアーゼによる、形成された蛋白質に対する蛋白質分解作用に起因している。

発明が解決しようとする課題

それ故、本発明の課題は、遠位工学的な方法で、発育の定常期でも蛋白質を形成することができ、安定に増殖することができ、それ故増殖能の取手を断絶することのできる、蛋白質の製造を暗示することである。

課題を解決するための手段

本発明により、この課題は、真核生物の宿主細胞に所望の蛋白質の遺伝子を含有する組換え体DNA分子で発質転換し、細胞を増殖し、かつ発現後に遺伝子生産物を単離することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物を製造する方法において、宿主細胞として、プロテアーゼA及びBが欠損している酵母株を使用することにより解決される。

ヒカルボキシペンタデケーゼY及びBが欠損している。更に、この宿主株はアザニン、ヒスタジン及びリジンの生合成において栄養要求性を有する。栄養要求性とは、微生物（細菌又は酵母の菌株）が例えばアミノ酸のような一定の成分を単なる耐性体から合成し得る能力を持つていないことを要する。相応する野生型株とは反対に、栄養要求性菌株は所謂減少増殖では生育しない。その代りに、自身で合成することのできない成分に必要な成分を含有する完全増殖を必要とする。微生物は1種のあるいは複数の底質因子に対して栄養要求性であつてよい（B. L. Winnacker 著、"Gene und Klobe", 付録D, Verlag Chemie 出版（1985年））。

本発明の他の優れた実施形態では、前記のプロテアーゼ欠損酵母株を他の栄養要求性及び/又は薬剤感受性酵母株と交雑し、産子形成後、栄養要求性及び/又は感受性を介して生成ハイブリッド株から選択することにより、少なくともプロテアーゼA及びBが欠損しておりかつ増殖

付加的に、酵母株でプロテアーゼDが欠損しているとされている。

他の優れた実施形態では、プロテアーゼA、B及び場合によりDが欠損していることに加えて、カルボキシペンタデケーゼY及びBの少なくとも一方が欠損している酵母株を使用する。本明細書におけるプロテアーゼ及びカルボキシペンタデケーゼの表記の仕方は「酵母（Yeast）」、1巻、139〜154頁（1985年）に相応する。

本発明方法で、このようなプロテアーゼ欠損酵母株を使用することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物を酵母中で高い収率で製造することができ、その別に著しく長い増殖時間でもあるいは引続いて行なう公知方法による単離の際にも蛋白質分解作用、従つて蛋白質の失活化は起らない。

本発明の特に優れた実施形態では、宿主細胞として酵母株 ABYSO-11、DSM 4322 を使用する。この宿主株はプロテアーゼA、B、D及

の栄養要求性及び/又は薬剤感受性の少なくとも一方を有する酵母株を分離し、かつこのハイブリッド株を宿主細胞として使用する。

薬剤感受性とは、一定の薬剤、例えばメトトレキサート、クロラムフェニコール及びゲンタマイシン誘導体G 4.1 Bを含有する増殖中では生育しない微生物の特性を要する。微生物にこれらの薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子を含有する組換え体DNA（ガヒドロフォレートリダクターゼ、DHFR；クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ、CAT；トランスポゾン Ta 6.1 コード化アミノグリコシド・ホスホトランスフェラーゼ等）で微生物を形質転換後に初めて微生物は増殖中で生育できる。例えば、交雑及び産子形成は、シャーマン及びその他者（Sherman et al.）、"メソズ・イン・イースト・ジエネティクス（Methods in Yeast Genetics）"（Cold Spring Harbor Laboratory 出版、Cold Spring Harbor, New York 刊（1984年））と同様にして実施す

ることができる。不発明の時に使われた発形態では、酵母株 ABYSO - 11, DSM 4322 (a, pra 1, prb 1, prc 1, prd 1, cpe 1, eda 1 ya hsa 7) を、欠陥マルターゼ構造遺伝子並びにクラシル-及びヒスチジン組換え配に於ける栄養要求性もしくはヒスチジン-, ロイシン-, フラグルン-及びトリプトファン生産配における栄養要求性を有する酵母株 DCY 2824 - 1A (α mal 18-ura 3-52 hsa 4), DSM 4317 又は DBY 746, DSM 4316 (α hse 3-α1 leu 2-3 leu 2-112 ura 3-52 zrp 1-289a) と交雑させる。その後、有利に、プロテアーゼ A, B 及び融合酵母 D 並びにカルボキシプロテアーゼ Y 及び B が欠陥しておりかつ付加的に耐糖の少なくとも1種もしくは複数の栄養要求性、例えばクラシル-, リジン-及びマルターゼ有酸化 (Verwertung) 栄養要求性又はロイシン-及びトリプトファン栄養要求性あるいはロイシン-, クラシル-及びヒスチジン栄養要求性を有するハ

イブリッド株を準備する。

それ故、不発明の他の使われた発形態では、組換え体 DNA 分子が所望の産物又は蛋白質含有遺伝子生産物の遺伝子に加えて、宿主株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性を相補する遺伝子1種又は数種を含有する。

本発明の使われた発形態により、形質転換された宿主細胞と形質転換されていない宿主細胞との簡単な区分が可能である。宿主株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性1つ以上を相補する遺伝子の存在及び発現は、形質転換された細胞を、例えば宿主細胞自体が融合することのできないアミノ酸を含有していないが、組換え体 DNA 分子上にその遺伝子が存在している増地上でも取育させることができる。これに対して、形質転換されていない、従って組換え体 DNA 分子及びその上に含有されている栄養要求性相補性遺伝子を有していない宿主株はこのような増地中では成育し得ない。これにより、簡単に、形質転換された宿主細胞の選択を行なうことができ、そ

れ故、所望の蛋白質の遺伝子を含有する組換え体 DNA が細胞の間に失われる危険も回避される。それというのも生産可能性は形質転換されなかつた細胞によつては生じないからである。

場合により、宿主株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性を、この宿主細胞の栄養要求性もしくは薬剤感受性を相補する遺伝子1種以上を導入することにより克服することもできる。しかしその時に、所望の生産物の遺伝子を含有する宿主細胞を選択する簡単な可能性は認められない。

組換え体 DNA 分子には、酵母細胞を形質転換することができるかつ外來遺伝子が発現することのできるすべての組換え体 DNA 分子が該当する。この際に、例えばプラスミドの染色体外転写が認めするばかりでなく、所望の蛋白質の遺伝子をそれぞれ完全な発現カセット〔プロモーター、ターミネーター、調節遺伝子、転写加速遺伝子; Transkriptionsverstärker 等〕を含有する統合ベクター (Integrationsvektor) 又は統合性 DNA フラグメントを介して酵母ゲノム中に取

込みかつ酵母細胞の蛋白質と一様に発現することもできる。このための前提は組換え体 DNA 分子及び染色体の酵母配列上の相関性の存在である。そのような相関性領域を介して、統合性 DNA フラグメントを公知方法により酵母染色体中に導入することができる。

それ故、不発明の他の使われた発形態では組換え体 DNA 分子はプラスミドあるいは統合ベクター又は統合性 DNA フラグメントである。プラスミドとしては、細胞中で高いコピー数で産出する酵母プラスミドが特に使われている。例えば、このような酵母プラスミドは酵母/5, コリーハイブリッドベクター ("シヤトルベクター") であり、これは YRp, YEp, YIp 及び YCp として表わされる。YRp - 及び YRp - プラスミドだけが細胞中で高いコピー数で産出する。これらのプラスミドは酵母染色体の複製とは関係なく酵母プラスミドの独立した複製を可能にする配列の存在に於いておりかつ一般に細胞1個当たりコピー5〜40の個数で存在する。Yip プラス

ミドは酵母ゲノム中への統合によつて発現されるに過ぎない。それ故、それは統合ベクターの例である。YIP プラスミドは $1/10$ の低い形質転換率を有するが、そのために YEP- 及び YEP プラスミドに比べて著しく高い安定性を有する。YEP- 及び YEP プラスミドは選択圧なしで細胞増殖の源に失われ得る["Nature", 305, 591~597頁(1983年)]。しかしそのような選択圧は、栄養要求性又は細胞感受性の宿主株の融解を最小増地中で又は宿主株が感受性である一定の薬剤を含有する増地中で無難にかつ付加的に細胞体系 DNA が栄養要求性又は感受性を相補する遺伝子1個又は数個を有する本発明の優れた発現形に生じる。

本発明により、相同性又は非同源性蛋白質又は蛋白質含有産物生産物が高収率でかつ蛋白質分解作用をしない形で発現可能であり、その前にまた発現転換された細胞の選択並びにそれ取所産物の遺伝子生産物の収率を高めることも簡単に実施することが出来る。細胞を融解するホ

ホ及び公知方法により遺伝子生産物を取得する場合の場合にも、宿主細胞のプロテアーゼ欠損のために形成された生産物に対する無阻分解作用は遅延される。

本発明の優れた発現形において蛋白質の α -グルコシダーゼ PI が製造される(例4参照)。実施例

次に、本発明を実施例により詳説する。

例 1

サツカロミセス株 ABYSMAL 81 及び ABYSMAL 81 の製造に當り、プロテアーゼ A, B 及び D 並びにカルボキシペプチダーゼ Y 及び S が欠損しておりかつ付加的にアデニン-, ヒスタジン- 及びリジン生合成能における栄養要求性を有する一倍体のサツカロミセス・セレビシエ菌株 ABYS-11 (ura3-52 his4 prf1 cpa1 ade1 lys his7), DSM 4522 を、欠陥 α -グルコシダーゼ誘導減産子及びウラシル- 及びヒスタジン生合成能における栄養要求性を解除とするサツカロミセス・カールスベ

ルゲンス(*Saccharomyces carlsbergensis*) 菌株, TCY 2824-1A (ura3-52 his4), DSM 4317 と交雑した。

引続いて、孢子形成を行ない、かつ生じた酵母分生子をその栄養要求性について種々の選択増地中で平板培養しかつプロテアーゼ欠損について細胞融解増地中でプロテアーゼ活性を測定することにより試験した。菌株 ABYSMAL 81 (ura3-52 his4 prf1 cpa1 ade1 lys his7) 及び ABYSMAL d1 (ura3-52 his4 prf1 cpa1 ade1 lys his7) は次のようにして同定した:

プロテアーゼ欠損の検出

分生子を YEPD 増地(酵母エキス2%, ペプトン2%, グルコース2%)5ml 中で培養させ、対収期後期から産生早期の発育相の細胞を採取し、2回水で洗いかつガラスビーズを用いて細胞ミックス(Whirlmix)で均質化することにより碎解する["MGG", 145巻, 327~333頁(1976年)]。細胞を20mM

/トリリス(pH7.0)1M で抽出しかつ遠心分離後に上澄みを粗製エキスとして更に加工処理した。プロテアーゼの活性化のために粗製エキスを pH5.0 に調整しかつ25°C で24時間恒溫保持した。

プロテアーゼA欠損(prf1)の検出

細胞エキスを1.2% - 濃度性ヘモグロビンの加水分解なし, pH3.0 ["Eur. J. Biochem.", 42, 621~629頁(1974年)]

濃度性したヘモグロビン1.2%を含有する0.1mM / β -ラタート緩衝液(pH3.0)0.5ml を細胞融解物0.1ml と25°C で恒溫保持した。30分後に、10% - トリクロロ酢酸0.5ml で反応を停止しかつ遠心分離後にトリクロロ酢酸可溶性生産物を200nm で吸光度測定するか又はマクドナルド及びチエン [McDonald 及び Chen 共著, "Anal. Biochem.", 10巻, 175~177頁(1965年)] による変性フォリン測定より測定した。

比活性の計算に當つてザーメンホフ (Zamenhof) による蛋白質測定を行なつた ["Methods Enzymol.", 3巻, 702頁 (1957年)]。

プロテアーゼA欠損は、酸溶性ヘモグロビンに対する細胞溶解物の特異的な加水分解活性が野生型株に比べて5%より低い数値に低下した場合に認められる。

プロテアーゼB欠損 (prb1) の検出

pH7で細胞エキスをよる2.4% - アゾコル (Azocol) の加水分解なし ["Eur. J. Biochem.", 42巻, 621~626頁 (1974年)]

0.1 mol/l δ -ホスフエート緩衝液 (pH7.0) 中の2.4% - アゾコル懸濁液0.5 mlを細胞溶解物0.1 mlと振盪下に25°Cで恒温保持した。

プロテアーゼBの活性化に基く粗製エキスを活性測定前にドサシル硫酸ナトリウム (最終濃度0.25%) を加えた。

30分後に、反応を10% - トリクロロ酢酸0.5 mlの添加により停止しかつ遠心後、上清を

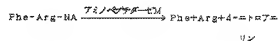
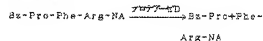
中の吸光度を550 nmで測定した。

プロテアーゼBは、アゾコルに対する細胞溶解物の加水分解比活性が野生型株に比べて5%より低い数値に低下すると欠損している。

プロテアーゼD欠損 (prd1) の検出

アミノペプチダーゼMの存在における5.0 mmol/l δ -トリス/マレエート緩衝液 (pH7.0) 中で0.5 mmol/l δ -Bz-Pro-Phe-Arg-NA (ベンザイル-L-プロピル-L-フェニルアラニン-L-アルギニン-p-ニトロアミド) は細胞エキスをより加水分解されない ["J. Biol. Chem.", 260巻, 4585~4590頁 (1985年)]

試験原液:



0.5 mol/l δ -トリス/マレエート緩衝液 (pH

7.0) 0.05 mlを1.0 mmol/l δ -Bz-Pro-Phe-Arg-NA (ジメチルスルホキシド中に溶解) 0.015 ml, アミノペプチダーゼM 0.1 ml (4.0 mg, 240 mU), 水0.145 ml及び粗製エキスを0.1 mlと混合し、かつ405 nmの吸光度変化を試験管検体に対して測定した。

プロテアーゼDは、Bz-Pro-Phe-Arg-NAに対する加水分解比活性が野生型株に比べて10%より低い数値に低下した場合に欠損している。カルボキシペプチダーゼY欠損 (prc1) の検出

0.5 mmol/l δ -ベンザイル-L-チロシン-4-ニトロアミド (pH7) の細胞エキスをよる加水分解なし ["Arg. Biol. Chem.", 35巻, 658~666頁 (1971年)]

チオキシコレートで活性化した (最終濃度0.5%) 粗製エキスを0.1 mlを0.1 mol/l δ -ホスフエート緩衝液 (pH7.0) 1 ml及び3 mmol/l δ -ベンザイル-L-チロシン-4-ニトロアミド (ジメチルスルホキシド中に溶解) 0.2 ml

と25°Cで恒温保持した。10分後に1 mmol/l δ -塩化水銀1 mlで停止しかつ遠心したp-ニトロアミリンを410 nmで測定した。

カルボキシペプチダーゼY欠損は、ベンザイル-L-チロシン-4-ニトロアミドに対する加水分解比活性が野生型株と比べて5%より低い数値に低下した場合に存在する。

カルボキシペプチダーゼS欠損 (cps1) の検出

pH7.4で細胞エキスをよるCbz-Gly-Leu (ベンジルオキシカルボニル-グリシン-L-ロイシン) の加水分解なし (次にL-アミノ酸オキシダーゼ-ペルオキシダーゼ試験で遊離ロイシンの分析) ["Eur. J. Biochem.", 73巻, 553~556頁 (1977年)]

試験原液(0.25 ml) δ -L-アミノ酸オキシダーゼ, 0.4 ml/ml 西洋ワサビペルオキシダーゼ及び0.5 mmol/l δ -MnCl₂ 0.5 ml, 27.5 mmol/l δ -Cbz-Gly-Leu 溶液 (0.2 mol/l δ -ホスフエート緩衝液, pH7.0中に溶解) 0.4

as, o-ジアニシジンジヒドロクロリド(2mg/ml, H₂O中に溶解)0.05ml, 22mmol/lのフェニルメチルホルムルオリド0.05ml及び透析した細胞溶解液(透析:0.1モル塩化イミダゾール, pH5.5; 24時間; 25℃)0.1mlを混合し405nmで吸光度変化を測定した。

カルボキシペプチダーゼY欠損株、Cbu - Oxy - Leu に対する加水分解比活性が野生型株と比べて5倍より低い値に低下した割合に存在する。

典型の検出法に添つき、菌株ABYSDMALと1ではプロテアーゼA, B, D及びカルボキシペプチダーゼY及びBが欠損し、かつ菌株ABYSDMALと1ではプロテアーゼA, B並びにカルボキシペプチダーゼY及びBが欠損していることが確認された。

マルトース有効化栄養要求性の検出

酵母培養ベース(YNB, 塩-ビタミン混合物, Difco)0.67g, カザミノ酸(CAA, 毎白質

水解物, Difco)0.5g, マルトース(唯一のC源)2g, クラシル20mg/l及びアデニン30mg/lを含有する台成完全増地Ⅰ上で発育せず。

クラシル栄養要求性の検出

YNB 0.67g, CAA 0.5g, グルコース(唯一のC源)2g及びアデニン30mg/lを含有する台成完全増地Ⅰ上で発育せず。

リジン栄養要求性の検出

クラシル(20mg/l)を含有するが、リジンを含有しない台成完全増地Ⅰ(CAA 0.5gの代りにリジンを含有しないアミノ酸混合物を使用した)上では発育せず。

ヒスタジン-及びアデニン栄養要求性の検出

クラシル(20mg/l)を含有するが、アデニン及びヒスタジンを含有しない台成完全増地(CAA 0.5gの代りにヒスタジンを含まないアミノ酸混合物を使用した)上で発育。

例2及び3

サツカロミセ株ABYSD 91 (sau 2-3,

2-112 srp 1-289a Fra 1 prb 1 prd 1
pre 1 cps 1), ABYSD 106 (ura 3-52
sau 2-3, 2-112 his pra 1 prb 1 prd 1
pre 1 cps 1), ABYSD 91 (sau 2-3, 2-112
srp 1-289a pra 1 prb 1 pre 1 cps 1)
及びABYSD 106 (ura 3-52 sau 2-3, 2-112
his pra 1 prb 1 pre 1 cps 1)を製造するに当り、例1に記載したように、サツカロミセ・セレピシエ菌株ABYSD-11をサツカロミセ・カールスベルゲンシ菌株DEY 746, DSM 4316と交雑させた。担子形成後、酵母分離体をそのプロテアーゼ欠損及び栄養要求性について試験した。

ABYSD 91及びABYSD 91について:

プロテアーゼ欠損の検出

例1参照

ロイシン-及びトリプトファン栄養要求性の検出

クラシルを含むが、ロイシンもしくはトリプトファンを含まない台成完全増地Ⅰ(0.5g

CAAの代りにロイシンもしくはトリプトファンを含まないアミノ酸混合物を使用した)上で発育せず。

クラシル-, アデニン-, ヒスタジン-及びリジン-栄養要求性の検出

アデニン, クラシル, ヒスタジン及びリジンを含有しない台成完全増地Ⅰ(0.5g CAAの代りにヒスタジン及びリジンを含有しないアミノ酸混合物を使用した)上で発育。

ABYSD 106及びABYSD 106について:

プロテアーゼ欠損の検出

例1参照

クラシル栄養要求性の検出

台成完全増地Ⅰ上で発育せず。

ロイシン-及びヒスタジン栄養要求性の検出

クラシルを含むが、ロイシンもしくはヒスタジンを含有しない台成完全増地Ⅰ(0.5g CAAの代りにロイシンもしくはヒスタジンを含まないアミノ酸混合物を使用した)上で発育せず。

アダニン、リジン及びトリプトファン核酸
基性の抽出

ワラルを含有するが、アダニン、リジン及
トリプトファンを含有しない完全発芽抽出
(0.5% CAA の代りにロイニン及びトリプト
ファンを含有しないアミノ酸混合物を使用し
た)で培養。

例 4

α -グルコシダーゼ P I の発現

サツカロミセス菌株 ANYSMAL 81 (例 1) を
プラスミド Ysp / 506b3 で形質転換した
["Nature", 275巻, 104~109頁
(1978年)]。

このプラスミドの製造に當つて、ベクター
Ysp / OLUPI, DSM 4173 を明瞭エンドヌ
クレアーゼ Sap I 及び Hind III で消化し、約
3.0 kbp の長さの Sap I / Hind III - フラグメ
ントを分離し、かつ Ysp 2.4 からの分断 Pvu II
/ Sap HI - ベクターフラグメント ["Gene",
8巻, 17~24頁(1979年)]; Cold

Spring Harbor, "Symp. Quant. Biol.",
43巻, 77~90頁(1979年); "Gene",
29巻, 113~124頁(1984年);
"Nature", 286巻, 860~865頁
(1980年)]中にタレノウポリメラー
ゼで Hind III の突出び一末端を充填しかつ Sph
I 制限切断位所の突出び一末端を分断後一連断
した。生じたプラスミド Ysp / 54 中で α -
グルコシダーゼ P I 発現カセットが平行配向
(gleichlaufige Orientierung) でターミ
ナレーゼ処理に適合している。その後、Ysp
/ 54 の Bam HI - 制限切断位所中に、MAL 2-
50p - 類似子を含有する長さ約 3.1 kbp の Bam
HI - フラグメントが導入した。そのためにプラ
スミド pBM2, DSM 4314 を明瞭エンドヌ
クレアーゼ Sma I で消化し、突出び一末端をタ
レノウポリメラーゼで消化し、Bam HI リンカ
["d(CGGGAATCCCG)"] を導入し、Bam HI で後
から脱離しかつ長さ 3.1 kbp の MAL 2-80 p -
類似子を含有する Bam HI フラグメントを分離

する。この生成ベクターを Ysp / 506b3 と接合
した。

形質転換した菌株をマルトースを含有す
る YBP 増地 (酵母エキス 1%, ペプトン 2%)
中で生育させた後期対数期もしくは定常期ま
で増殖した。引続いて、バイオマスを採取しか
つ 10 mmol / l - ホスファート緩衝液 (pH
6.8) で洗浄した。YBP 増地 5 ml (酵母約 0.1
~0.2 g, 湿式重量) からの細胞を回転ミツツ
ス ("Mirlmix") で均質化することにより碎断
した ["MOG", 145巻, 327~333頁
(1976年)]。

α -グルコシダーゼ比活性の測定は p - ニ
トロフェニル - α - D - グルコピラノシドの加水
分解 ["MOG", 151巻, 95~103頁
(1977年)] 及びザーメンホフによる蛋白
測定 ["Methode Biochem.", 3巻, 702
頁(1957年)] に依り行なつた。

このようにして得られた粗製エキス中でその
酵素は 4°C で 1 日以上安定であつた。BDS ゲ

ル電気泳動でもこの期間にバンドパターンの変
化は認められなかつた。このことは、この上澄
み中に含まれる他の酵素及び蛋白質もこの酵
素中で安定しておりかつ着しくは滅菌分解作
用を受けないことを示す。

例 1 中で、パン酵母 (Deutsche Hefewerke
Nürnberg, DHW) の α -グルコシダーゼの基
質安定性をプロテアーゼが欠損している α -
グルコシダーゼ形質転換株中の経路を促進させ
た α -グルコシダーゼの安定性と比較して掲載し
た。パン酵母では α -グルコシダーゼ比活性は
対数期後期乃至定常期初期で最大になる。細胞
が死に進行すると α -グルコシダーゼ比活性は
著しく低下する(例 1)。これは比較に、定
常発育期に達した後でもプロテアーゼが欠損し
ている形質転換された α -グルコシダーゼは安定して
維持されて腐敗的であり、それ故バイオマスの腐
敗及び滅菌処理は著しく簡便になる。

菌液増地:

パン酵母: 1% 酵母エキス, 2% ペプトン,

2番マルトース

ABYSMAL B1: 合成完全増殖Ⅱ

例 5

α-グルコシダーゼのN末端部とHIV1抗原
とより取る融合蛋白質をプロテアーゼ欠損酵母
株中で非相同発現

α-グルコシダーゼPI発現ベクターYEp/
506b3(例4)中で、α-グルコシダーゼ
PIの約500bpをコード付する長さ1.4 kbp
のBglⅡフラグメントをHIV1-レトロウィル
スのgp41 膜蛋白質の一部をコード付する長
さ約300 bpのDNAフラグメントに対して交
換した。そのために、長さ約300 bpのBam
Ⅰ/HindⅢ-フラグメント(配列: "CdeL",
45巻, 637~648頁(1986年))の第
1図の1638~1943のWMC-1の配列部
分をHindⅡ及びHindⅢで消化したE. コリ
ベクターpUC18(4133 bp)及びpUC19,
配列: "CdeR", 33巻, 103~119頁
(1985年))中にサブクローニングした(例

造: pUC18HRH.300)。pUC18HRH.300から長さ
約300 bpのBamⅠ/HindⅢ-フラグメン
トを分離しかつ長さ約5.2 kbpのpUR278 Bam
Ⅰ/HindⅢ-ベクターフラグメント中に連結
した(配列: "EMBO", 2巻, 1791~
1794頁(1983年)) (構造: pUR 278
HRH.300)。プラスミドpUR 278 HRH.300を
HindⅢで消化し、突出5'末端を"クレンワボ
リメラーゼ"で消化しかつBamⅠ-リンカー
[d(GGGATCCC)]を挿入する。その後、BamⅠ
で消化し、長さ約300 bpのBamⅠフラグメン
トを分離しかつ長さ約1.1 kbpのYEp/
506b3 BglⅡ-ベクターフラグメント中に発現
した。gp41-膜ポリペプチド-DNAの正しい
配向で、α-グルコシダーゼのN末端(アミ
ノ酸50個)、融合部位に構造を条件とするアミ
ノ酸4個、gp41-膜蛋白質のアミノ酸101
個及び(末端に構造を条件とするアミノ酸3個
より成り、分子量約18500Dの融合蛋白質
が生成する。所望の構造物は形質転換しかつ増

殖した(下記図)後のプロテアーゼ欠損酵母
株株株ABYSMAL B1中の発現融合蛋白質を介し
て、次いでSDSゲル電気泳動及びウェスタンブ
ロットを行なつてヒトHIV1血清との免疫反応
に依りて分離した。融合蛋白質は全蛋白質の約
5%で発現しかつターミネーター部位にSDSポリ
アクリルアミドゲル中の酸性バンドとして観察
することができた。

α-グルコシダーゼPI-gp41融合蛋白質を
発現するために、形質転換体をグルコース2%
及びマルトース2%を含む選択増殖(YNB
0.67%, CAA 0.5%, アザニン30mg/8)
上で発育させた。10~20時間の誘導期後
(グルコース消費後)細胞を採取した。

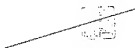


表 1

マルトース2%を含む完全培養液中のパン酵母と最少増殖(YNB 0.67%, CAA 0.5%, アザニン30mg/l 及びグルコース2%) 中のプロテアーゼ分解物質転換体 ABYSMAL 81-50603 との糖液中の α-グルコシダーゼ 活性(OD / 蛋白質量) と比較

培養時間 消化	0 時間		3 時間15 分		6 時間30 分		24 時間		36 時間	
	OD ⁴⁹⁰	α-Gluc.	OD ⁴⁹⁰	α-Gluc.	OD ⁴⁹⁰	α-Gluc.	OD ⁴⁹⁰	α-Gluc.	OD ⁴⁹⁰	α-Gluc.
パン酵母 (DHW-Deutsche Hefewerke Würzburg)	3.5	1250	-	-	15	1600	25	1530	25	400

		5 時間	10 時間		15 時間		20 時間		30 時間		50 時間	
ABYSMAL 81 -	1.4	1600	9	3800	17	7500	21	8600	25	9800	26	9800
SC623												

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁷

識別記号

序内整理番号

C 12 N 1/18

7421-4B

// C 12 N 15/21

Z

7823-4B

(C 12 P 9/26

C 12 R 21/00

C 12 R 1:865)

優先権主張

⑤1989年2月17日西ドイツ(DE)⑤P3804890

⑥発明者

エアハルト・コベツツ

ドイツ連邦共和国トウツィング・トラウビンガー・シュト

キー

ラーセ 60

⑦発明者

ギエンター・シユーマ

ドイツ連邦共和国ベルリンリート・カペレンシュトラーセ

ツハー

20